

## بررسی وضعیت آرایه‌شناسی جویبار ماهیان (Nemachilidae) جنس *Turcinoemacheilus* در رودخانه گاوهرود با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز (COI)

### چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی وضعیت آرایه‌شناسی جمعیت جنس *Turcinoemacheilus* رودخانه گاوهرود از حوضه تیگریس بر اساس ژن زیر واحد ۱ سیتوکروم اکسیداز (COI) و ریخت‌شناسی آن در سال ۱۳۹۵ به اجرا درآمد، چراکه ویژگی‌های ریختی شامل ریخت سنجی و الگوی رنگی این جمعیت کاملاً متفاوت از سایر جمعیت‌های گزارش شده این جنس در حوضه تیگریس بود. برای این منظور پس از نمونه‌برداری، DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفرم استخراج و ژن سیتوکروم COI طی فرآیند PCR تکثیر و پس از خالص‌سازی توالی یابی شد. بر اساس نتایج نمونه‌های رودخانه گاوهرود در درخت تبارزایی ترسیم شده با سایر جمعیت‌های گونه *Turcinoemacheilus kosswigi* بافاصله ژنتیکی ۰/۶۱ درصد در یک کلاد قرار گرفتند. به‌علاوه این جمعیت *T. kosswigi* تفاوت ریختی مشهودی را با سایر جمعیت‌های آن نشان داد و به‌واسطه داشتن باله دم بزرگ و صاف (در مقابل کمی فرورفته بودن)، فقدان لکه سیاه پرننگ در قاعده باله پستی و تجمع وجود لکه‌های ملانوفور در محل اتصال باله دم قابل تشخیص می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** تبارشناسی، تیگریس، تنوع ریختی، جویبار ماهی، توالی میتوکندریایی.

### مقدمه

تاکنون مطالعات متعددی بر روی وضعیت آرایه‌شناسی ماهیان آب‌های داخلی ایران صورت گرفته است، ولی با این وجود ابهامات زیادی در ارتباط با وضعیت آرایه‌شناسی بسیاری از گونه‌ها وجود دارد. خانواده جویبار ماهیان (Nemacheilidae) بعد از خانواده کپور ماهیان دارای بیشترین تنوع از لحاظ تعداد گونه (۴۵ گونه) در ایران می‌باشد (Eagderi et al., 2019; Esmaili et al., 2018) و با داشتن بیش از ۲۵ گونه بومزاد (۳۴ درصد از مجموع فون ماهیان ایران)، از مهم‌ترین خانواده‌های ماهیان از لحاظ ذخایر ژنتیکی کشور محسوب می‌گردد که به دلیل اندازه کوچک و ارزش اقتصادی پائین از نظر آرایه‌شناسی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Tang et al., 2006; Çiçek et al., 2018). این خانواده در ایران شامل هفت جنس *Paraschistura*, *Paracobitis*, *Oxyneomacheilus*, *Eidinemacheilus*, *Turcinoemacheilus* و *Triplophysa* می‌باشد (Esmaili et al., 2018; Sayyadzadeh et al., 2019). جنس‌های این خانواده که کمتر مورد بررسی قرار گرفته، *Turcinoemacheilus* است که تاکنون ۴ گونه از این جنس شامل ۳ گونه بومزاد *Turcinoemacheilus bahaii*, *T. saadii* و *T. hafezi* و یک گونه بومی *T. kosswigi* از آب‌های داخلی ایران گزارش شده‌اند. گونه‌های این جنس بر اساس ویژگی‌های ریختی شامل قرار گرفتن باله شکمی در جلوی باله پستی، موقعیت جلویی منخرج و الگوی رنگی خاص از سایر جنس‌های خانواده Nemacheilidae متمایز شده‌اند (Esmaili et al., 2014). اعضای این جنس در بسترهای ماسه‌ای با

نسرین نیک‌مهر<sup>۱</sup>

سهیل ایگدری<sup>۲\*</sup>

هادی پورباقر<sup>۲</sup>

حمید فرحمند<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳، ۴. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

\*مسئول مکاتبات:

soheil.eagderi@ut.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۹-۰۲-۰۶۶۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۲

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی

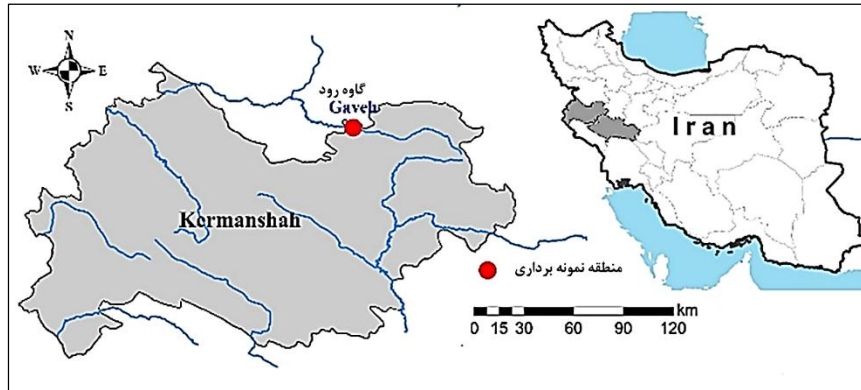
ارشد است.

شدت جریان بالا زیست می‌کند. بدن کشیده این ماهی کمک می‌کند تا از فضای خالی بین شیارها استفاده کند (Golzaripour *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد که سازگاری اعضای این جنس به جریانات سریع آبی به علت ارتفاع کم بدن، پوزه‌دراز و ارتفاع کم بدن باشد (Miyazaki *et al.*, 2007) که البته این تغییر ریختی می‌تواند به دلیل تغییر شرایط محیطی باشد. تغییرات ریختی در پاسخ به فشارهای محیطی سریع‌تر از تغییرات ژنتیکی بروز می‌کند تا شانس بقا موجود افزایش یابد، این تغییرات به‌عنوان سازگاری منطقه‌ای، باعث بروز ریخت‌های متنوع در سطح جمعیت‌ها می‌گردد (Karakousis *et al.*, 1991). به‌عبارت‌دیگر به نظر می‌رسد که گونه‌های این جنس قابلیت بالایی در سازگاری به محیط‌های زیست خود به لحاظ ویژگی‌های ریخت سنجی و الگوی رنگی دارند.

در گذشته تمام اعضای این جنس در ایران تحت عنوان *T. kosswigi* شناخته می‌شدند که به دلیل تنوع بالای ریختی جمعیت‌های مختلف درون گونه‌ای و به دلیل قابلیت بالای انعطاف‌پذیری ریختی آن‌ها، امکان تفکیک گونه‌ای وجود نداشت. بررسی اعضای این جنس بر اساس داده‌های مولکولی (بر اساس ژن میتوکندریایی COI) (Esmaili *et al.*, 2014)، وجود تنوع بالای اعضای این جنس را در ایران مشخص نمود. قدرت بالای ژن COI در حل مشکل آرایه‌شناسی گونه‌های ماهیان (تا ۹۸ درصد) گزارش شده است (Hebert *et al.*, 2004)، مطالعات صحرایی متعدد نشان داد که کلید ریختی ارائه‌شده برای شناسایی جمعیت‌های مورد بررسی قرار نگرفته این جنس در سیستم‌های رودخانه‌ای مختلف ایران کارایی ندارد، بنابراین برای درک وضعیت آرایه‌شناسی هر جمعیت مجزا نیازمند مطالعه مولکولی می‌باشد. از طرفی تنها توصیف ساختار استخوانی انجام‌شده از این جنس در گونه *T. hafezi* انجام شده است (Nikmehr *et al.*, 2016)، در این راستا تحقیق حاضر باهدف بررسی وضعیت آرایه‌شناسی نمونه‌های جنس *Turcinoemacheilus* در رودخانه گاوهرود از حوضه خلیج فارس (تیگریس)، استان کرمانشاه (شکل ۱) بر اساس ژن میتوکندریایی COI و مطالعه ریخت‌شناسی آن برای ارائه یک کلید شناسایی به اجرا درآمد چراکه ویژگی‌های ریختی شامل ریخت سنجی و الگوی رنگی این جمعیت کاملاً متفاوت از سایر گونه‌های گزارش شده این جنس در حوضه خلیج فارس بود.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌های جنس *Turcinoemacheilus* از رودخانه گاوهرود (سرشاخه رودخانه سیروان در منطقه تپه اسماعیل)، حوضه آبریز خلیج فارس (زیر حوضه تیگریس) توسط دستگاه الکتروشوکر مدل Samus 750P در طول ۱۰۰ متر از مسیر رودخانه نمونه‌برداری در فروردین‌ماه ۱۳۹۵ گردید (شکل‌های ۱ و ۲) و جهت بررسی مولکولی در اتانول ۹۶ درصد تثبیت شدند و طی دو مرحله بافاصله زمانی ۱۲ ساعت عملیات تعویض اتانول انجام شد. به‌علاوه بقیه نمونه‌ها جهت مطالعات ریخت‌شناسی در فرمالین فسفات خنثی ۵ درصد تثبیت و بعد از ۴۸ ساعت محلول تثبیت‌کننده فرمالین تعویض گردید. نمونه‌ها پس از ۲ هفته به محلول فرمالین ۷۲ درصد منتقل شدند. برای بررسی ویژگی‌های ریخت سنجی و مقایسه نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌های مطالعه Esmaili و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد.



شکل ۱: نقشه منطقه نمونه برداری، رودخانه گاوه رود، حوضه تیگریس.



شکل ۲: نمای جانبی (الف) *Turcinoemacheilus kosswigi* رودخانه گاوه رود- حوضه تیگریس، (ب)

*Turcinoemacheilus bahaii* از رودخانه زاینده - حوضه اصفهان، (ج) *Turcinoemacheilus hafezi* رودخانه

بهشت آباد - حوضه تیگریس و (د) *Turcinoemacheilus saadii* رودخانه دینوز - حوضه تیگریس.

استخراج DNA با استفاده از روش بهینه شده فنل-کلروفرم صورت گرفت. در این روش قطعات باله سینه‌ای سمت راست تعداد ۶ نمونه در بافر استاندارد STE به همراه پروتئیناز K به مدت ۲۴ ساعت هضم و سپس خالص سازی با استفاده از فنل و کلروفرم انجام شد. پس از رسوب و شستشوی DNA با الکل، در آب مقطر حل شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد و کمیت آن توسط دستگاه

نانودراپ موردسنجش قرار گرفت. به‌منظور تکثیر ژن COI از یک جفت پرایمر رفت‌وبرگشت (20 FCOI: 5'- AACCTCTGTCTTCGGGGCTA-3' و (20III: RCOI 5'-TTGAGCCTCCGTGAAGTGTG-3') استفاده شد. (Hashemzadeh-Segherloo *et al.*, 2012)

برای انجام واکنش PCR بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده پرایمرها (Thermo Scientific) از ۵۰ μL محلول PCR شامل ۲۵ μL محلول Taq 2X Mastermix red، مقدار ۱ μL از هر پرایمر، مقدار ۵ μL از DNA الگو و ۱۸ μL آب مقطر یونیزه شده درون میکروتیوپ ۲۰۰ μL استفاده شد. شرایط دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک چرخه ده‌دقیقه‌ای واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ چرخه یک‌دقیقه‌ای با دماهای ۹۴، ۵۸/۵ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای واسرشته‌سازی، اتصال پرایمر و تکثیر و درنهایت یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ سانتی‌گراد به‌منظور بست نهایی انجام شد. به‌منظور اطمینان از تکثیر ناحیه موردنظر ۵ میکرو لیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) و توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید و سپس برای مشاهده باندهای حاصل از تکثیر قطعه موردنظر، در معرض تابش UV قرار داده شدند.

به‌منظور توالی‌یابی قطعه موردنظر ابتدا محصول PCR توسط کیت خالص‌سازی بایونیر (Bioneer, Inc, Daejeon, Korea) خالص شد و سپس جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen, Inc, Daejeon, Korea) ارسال شد. قطعات تکثیرشده از دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند.

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit V 7.1.3 ویرایش شدند (Hall, 1999). عملیات انطباق توالی‌های ژن COI با استفاده از نرم‌افزار ClustalX (1.83) انجام شد. به‌منظور یافتن توالی‌های مشابه برای استفاده در بررسی تبارشناسی، توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از جستجوی Blast در بانک ژن NCBI با سایر توالی‌های موجود مقایسه شدند و سایر توالی‌های این جنس از بانک ژن استخراج گردید (جدول ۱). مدل تکاملی با استفاده از نرم‌افزار MrModeltest انتخاب گردید (Nylander, 2015). برای بررسی تبارشناسی به روش Bayesian inference از نرم‌افزار MrBayes v3.1.2 و تکرار ۱/۵ میلیون نسل (Ronquist *et al.*, 2012) و برای Maximum likelihood از نرم‌افزار MEGA6 و RaxML V 7.2.5 و ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Stamatakis, 2014). برای تعیین فاصله نوکلئوتیدی از روش K2P و نرم‌افزار MEGA6 استفاده شد (Kumar *et al.*, 2008). همچنین برای ترسیم دارنگاره‌های ایجادشده نیز از نرم‌افزار FigTree v1.4.2 استفاده گردید (Rambaut, 2015).

جدول ۱: لیست ژن‌های مورداستفاده در ترسیم درخت تبارشناسی مستخرج از بانک ژن همراه با شماره دسترسی، نام

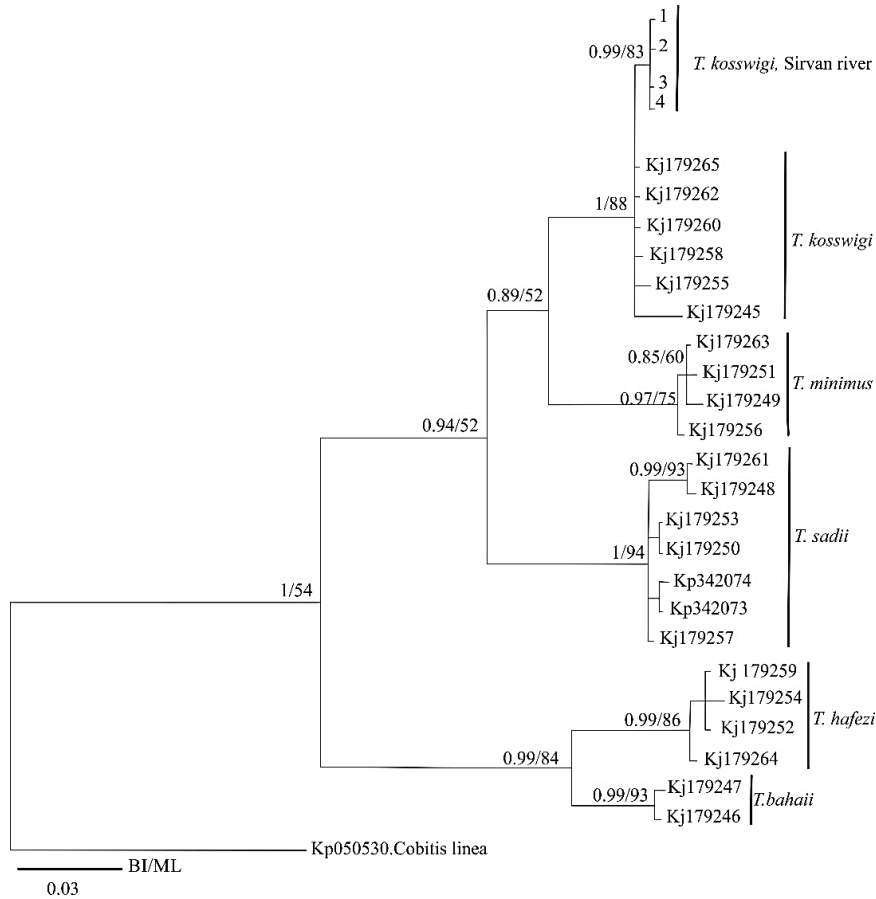
#### گونه‌ها و محل جغرافیایی آن‌ها.

شماره دسترسی بانک ژن	گونه	کشور	کشور
KJ179265	<i>Turcinoemacheilus kosswigi</i>	عراق	Great Zab drainage
KJ179262	<i>Turcinoemacheilus kosswigi</i>	عراق	Little Zab drainage
KJ179260	<i>Turcinoemacheilus kosswigi</i>	عراق	Little Zab drainage
KJ179255	<i>Turcinoemacheilus kosswigi</i>	عراق	Little Zab drainage
KJ179259	<i>Turcinoemacheilus hafezi</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179254	<i>Turcinoemacheilus hafezi</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179252	<i>Turcinoemacheilus hafezi</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179263	<i>Turcinoemacheilus minimus</i>	ایران	Euphrates drainage
KJ179256	<i>Turcinoemacheilus minimus</i>	ایران	Euphrates drainage
KJ179251	<i>Turcinoemacheilus minimus</i>	ایران	Euphrates drainage
KJ179249	<i>Turcinoemacheilus minimus</i>	ایران	Euphrates drainage

شماره دسترسی بانک ژن	گونه	کشور	کشور
KJ179261	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179257	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179253	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Karkheh drainage
KJ179250	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Karoun drainage
KJ179248	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Karoun drainage
KP342074	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Gamasiab River
KP342073	<i>Turcinoemacheilus saadii</i>	ایران	Gamasiab River
KJ179247	<i>Turcinoemacheilus bahaii</i>	ایران	زاینده‌رود
KJ179246	<i>Turcinoemacheilus bahaii</i>	ایران	زاینده‌رود
KP050530	<i>Cobitis linea</i>	ایران	EX82A7

### نتایج

در این مطالعه توالی زیر واحد ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) تعداد ۴ نمونه متعلق به جنس *Turcinoemacheilus* به طول ۶۵۰ باز به دست آمده آمد. نتایج بررسی تحلیل مدل تکاملی با استفاده از نرم افزار MrModeltest مدل GTR+I+G با تکرار ۴ میلیون نسل را پیشنهاد نمود. در ترسیم دارنگاره با داده‌های حاصل از بانک ژن، هر دو دارنگاره مستخرج از روش‌های Maximum likelihood و Bayesian inference دارای شکل مشابه بودند، به همین دلیل از دارنگاره Bayesian استفاده و اعداد بوت استرپ حاصل از هر دو آزمون بر روی گره‌ها درج گردید. بر اساس این دارنگاره، نمونه‌های مورد مطالعه جنس *Turcinoemacheilus* رودخانه سیروان در شاخه *T. kosswigi* قرار گرفت و همراه *T. minimus* و *T. saadii* شاخه اول را تشکیل دادند و شاخه دوم نیز شامل دو گونه *T. bahaii* و *T. hafezi* بود (شکل ۳).



شکل ۳: دارنگار ترسیم‌شده به روش BI و ML.

شماره دسترسی نمونه‌های بانک ژن در جلوی آن‌ها نوشته شده است، اعداد بالای گره‌ها عدد Bootstrap به دست آمده است. برای ML حدود ۱۰۰۰ تکرار و برای BI ۱۰ میلیون نسل محاسبه گردید.

رنگ بدن نمونه‌های مورد بررسی زرد کم‌رنگ تا کرم با یک ردیف لکه‌های نامنظم زیتونی در طول جانبی بود که اندازه این لکه‌ها به سمت باله دمی افزایش می‌یابد. در محل ابتدای باله دمی یک لکه عمودی تیره وجود دارد. سطح شکمی سر و بدن سفید مایل به کرم و بدون الگوی رنگی بوده و سطح پشتی سر نیز زیتونی‌رنگ است. باله‌های پشتی و دمی شفاف بوده و نقاط تیره‌ای روی شعاع‌ها وجود دارد (شکل ۲). داده‌های ریخت‌سنجی نمونه‌های جمعیت *T. kosswigi* گاوه‌رود در جدول ۲ ارائه شده است، مقایسه داده‌های جمعیت مورد مطالعه با نمونه‌های *T. kosswigi* رودخانه سزار (Golzarianpour et al., 2009) تفاوت‌های متعددی را در عمق ساقه دمی، فاصله پسین باله پشتی، عرض دهان، طول پوزه و فاصله داخلی چشم نشان داد.

جدول ۲: داده‌های ریخت سنجی نمونه‌های جمعیت *Turcinoemacheilus kosswig* رودخانه گاوهرود (تعداد=۱۲ عدد) (نمونه‌برداری شده در بهار ۱۳۹۵).

حداقل-حداکثر میانگین انحراف معیار			صفات
۳۱/۸-۲۵/۴			طول استاندارد
			نسبت به طول استاندارد
۰/۸	۱۳/۴	۱۴-۱۲/۵	بیشترین عمق بدن
۰/۶	۹/۴	۱۰-۸/۸	عمق ساقه دم
۲/۶	۵۶/۷	۵۹/۵-۵۴/۵	فاصله پیشین باله پشتی
۱/۸	۴۵/۹	۴۳/۸-۴۷/۲	فاصله پسین باله پشتی
۰/۸	۵۲/۸	۵۳/۲-۵۱/۹	فاصله پیشین باله شکمی
۰/۴	۷۵/۴	۷۵/۶-۷۴/۹	فاصله پیشین باله مخرجی
۲/۱	۱۵/۷	۱۷/۸-۱۳/۶	طول ساقه دم
۱/۶	۱۴/۲	۱۵/۳-۱۲/۳	طول پایه باله پشتی
۳/۳	۱۵	۱۸/۷-۱۲/۵	عمق باله پشتی
۰/۷	۱۱/۱	۱۱/۸-۱۰/۷	طول پایه باله مخرجی
۱	۱۳/۲	۱۴/۱-۱۲/۱	عمق باله مخرجی
۱/۳	۱۴/۶	۱۶-۱۳/۴	طول باله سینه‌ای
۱/۱	۱۲	۱۳/۱-۱۰/۸	طول باله شکمی
۰/۹	۳۳/۳	۳۴/۳-۳۲/۸	فاصله بین باله شکمی-مخرجی
۰/۶	۲۲/۶	۲۲/۱-۲۳/۳	فاصله باله مخرجی-شکمی
۲/۵	۱۲/۱	۱۴/۷-۹/۶	عرض بدن
۰/۶	۴/۸	۵/۵-۳/۴	عرض ساقه دم
۰/۹	۱۳/۶	۱۴/۶-۱۲/۸	طول سر
			نسبت به طول سر
۴/۷	۶۲/۲	۶۶/۸-۵۷/۳	طول پوزه
۲/۶	۱۹/۵	۲۲/۴-۱۷/۲	خطی افقی بین بخش قدامی و خلفی چشم
۷/۹	۵۳/۴	۵۸/۸-۴۴/۴	فاصله نوک پوزه تا ابتدای چشم
۶/۴	۸۲/۳	۸۸/۲-۷۵/۴	عمق سر در قفا
۸/۶	۷۰/۴	۷۷/۹-۶۱	طول سر در قفا
۴/۹	۵۴/۸	۵۸/۸-۴۹/۴	عرض سر
۵/۵	۴۸/۵	۵۲/۵-۴۲/۲	فاصله داخلی چشم
۲/۵	۳۶/۹	۳۹/۷-۳۴/۷	فاصله بین دو سوراخ بینی
۵	۴۶/۸	۵۰-۴۰/۹	عرض دهان

با توجه به نتایج میانگین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *T. hafezi* و *T. sadii* (۱۴/۲ درصد) و کمترین آن‌ها بین *T. kosswigi* و *T. minimus* (۴/۷۵ درصد) بود. به علاوه فاصله ژنتیکی جمعیت *Turcinoemacheilus* رودخانه گاوهرود با سایر جمعیت‌های این گونه ۰/۶۱ درصد محاسبه گردید (جدول ۳).

جدول ۳: میانگین فاصله ژنتیکی K2P در بین گونه‌های مورد بررسی بر اساس درصد تمایز توالی ژن COI.

گونه	۱	۲	۳	۴	۵
۱ <i>T. kosswigi</i>					
۲ <i>T. hafezii</i>	۱۳/۰۵				
۳ <i>T. minimus</i>	۴/۷۵	۱۴/۰۱			
۴ <i>T. saadi</i>	۷/۳۲	۱۴/۲۰	۸/۲۶		
۵ <i>T. bahaii</i>	۱۱/۷۶	۴/۷۴	۱۲/۶۹	۱۴/۱۵	
۶ <i>T. kosswig</i> (Sirvan)	۰/۶۱	۱۲/۷۶	۴/۹۵	۷/۴۱	۱۱/۴۸

### بحث و نتیجه‌گیری

توالی ژن COI میتوکندریایی به‌طور گسترده در مطالعات تبارشناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا تغییرات آن نسبت به DNA هسته‌ای بسیار سریع‌تر بوده و در نتیجه توانایی بیشتری در بیان اختلافات بین گونه‌های نزدیک دارد (Ward et al., 2005). در پژوهش حاضر وضعیت آرایه‌شناسی جمعیتی از جنس *Turcinoemacheilus* رودخانه گاوهرود با استفاده از توالی ژن COI به اجرا درآمد. دارنگاره رسم شده در این مطالعه در تطابق با مطالعات قبلی Esmaeili و همکاران (۲۰۱۴) بود.

جنس *Turcinoemacheilus* توسط Nalbant و Bănărescu (۱۹۶۴) از سرشاخه‌های رودخانه زاب بزرگ در ترکیه توصیف گردید و اولین حضور آن در ایران بر اساس گزارش Golzarianpour و همکاران (۲۰۰۹) بود که البته این جمعیت در حال حاضر تحت عنوان *T. hafezi* شناخته می‌شود. اگرچه اعضای این جنس پراکنش وسیعی در آب‌های داخلی ایران داشته و به‌راحتی نیز به‌واسطه موقعیت قدیمی ابتدای باله شکمی در جلوی باله پستی قابل شناسایی هستند ولی گزارش آن‌ها از حوضه‌های داخلی ایران بسیار اندک می‌باشد (Esmaeili et al., 2014).

علاوه بر *T. kosswigi*، *T. hafezi*، Esmaeili و همکاران (۲۰۱۴)، دو گونه دیگر شامل *T. bahaii* از رودخانه زاینده‌رود (حوضه اصفهان) و *T. sadii* را از کارون (حوضه تیگریس) توصیف کردند. بر اساس کلید شناسایی ارائه‌شده توسط Esmaeili و همکاران (۲۰۱۴)، گونه *T. kosswigi* به‌واسطه طول استاندارد بیش از ۵۳ میلی‌متر و عمق ساقه دمی ۲/۲-۱/۹ برابر طول آن قابل شناسایی می‌باشد ولی در نمونه‌های صیدشده از رودخانه گاوهرود عمق ساقه به طول آن حدود ۱/۴ بود و همچنین الگوی رنگی این جمعیت کاملاً متفاوت از ویژگی‌های توصیف‌شده بود (Golzarianpour et al., 2013; Esmaeili et al., 2014).

بر اساس نتایج داده‌های مولکولی نمونه‌های رودخانه سیروان *T. kosswigi* هستند چراکه در شاخه *T. kosswigi* قرار گرفته و فاصله ژنتیکی این جمعیت با سایر جمعیت‌های آن ۰/۶۱ درصد بود. این تفاوت اندک با توجه به معیارهای فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها نمی‌تواند دلیلی بر تمایز این جمعیت به‌عنوان یک آرایه متفاوت باشد که حداقل حدود ۴/۷۵ درصد بین سایر گونه‌ها معتبر این جنس می‌باشد (Esmaili et al., 2014). همچنین مقایسه چندشکلی ژنتیکی نوکلئوتیدی *T. kosswig* و سایر جمعیت‌های مورد بررسی تنها در دو جایگاه ۲۱۳ (A→G) و ۳۱۵ (A→T) چندشکلی یافت شد که چندشکلی متداولی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه است. با توجه به مقایسه فواصل ژنتیکی K2P، نتایج همچنین نشان داد بیشترین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای متعلق به گونه *T. sadii* می‌باشد. با توجه به این‌که این گونه در شرایط محیطی متنوعی در زیر حوضه‌های کرخه و کارون از حوضه تیگریس پراکنش دارد و با توجه به توانایی پاسخ‌های فنوتیپی و در نتیجه تغییر ساختار ژنتیکی این تنوع درون گونه‌ای می‌تواند قابل توجیه باشد و چنین حالتی در گونه‌های ماهیان دیگر نیز گزارش شده است (Nicieza, 1995; Swain and Foote, 1999).

محل تیپ گونه *T. kosswigi* رودخانه زاب می‌باشد که در ادامه همانند رودخانه سیروان با شاخه اصلی رودخانه دجله وارد شده و در نهایت از طریق اروندرود به خلیج فارس وارد می‌شود. این فاصله جغرافیایی نزدیک به‌خوبی در تمایز ژنتیکی جمعیت‌های رودخانه گاوهرود (یکی از سرشاخه‌های رودخانه سیروان) با سایر جمعیت‌ها نمایان می‌باشد ولی علیرغم تفاوت اندک مولکولی، تفاوت ریختی بالایی بین آن‌ها وجود دارد. بر



اساس مقایسه آنها با داده‌های ریختی گونه *T. kosswigi* در مطالعات قبل این تفاوت ریختی قابل مشهود می‌باشد. بر اساس نتایج این جمعیت *T. kosswigi* از سایر جمعیت‌های این گونه به واسطه داشتن باله دمى بریده و صاف (در مقابل کمی فرورفته بودن)، فقدان لکه سیاه پرننگ در قاعده باله پشتی و تجمع وجود لکه‌های ملانوفور در محل اتصال باله دمى قابل تشخیص می‌باشد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران به اجرا درآمد.

### منابع

- Bănărescu, P. and Nalbant, T. T., 1964.** Süßwasserfische der Türkei. 2. Teil Cobitidae. Mitteilungen aus den Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut, 61:159-201.
- Çiçek, E., Fricke, R., Sungur, S. and Eagderi, S., 2018.** Endemic freshwater fishes of Turkey. FishTaxa, 3(4): 1-39.
- Çiçek, E., Eagderi, S. and Sungur, S., 2019.** *Oxynoemacheilus phoxinoides* (Erk'akan, Nalbant & Özeren, 2007): a junior synonym of *Oxynoemacheilus angorae* (Steindachner, 1897). FishTaxa, 4(1):13-17.
- Eagderi, S., Mousavi-Sabet, H. and Freyhof, J., 2019.** *Paraschistura makranensis*, a new loach from the Jegin River drainage in southern Iran with comments on *P. ilamensis* and *P. pasatigris* (Teleostei: Nemacheilidae). Zootaxa, 4668(2): 258-270.
- Esmaili, H. R., Sayyadzadeh, G., Özuluğ, M., Geiger, M. and Freyhof, J. 2014c.** Three new species of Turcinoemacheilus from Iran and Turkey (Teleostei: Nemacheilidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters, 24(3): 257-273.
- Esmaili, H. R., Sayyadzadeh, G., Eagderi, S. and Abbasi, K., 2018.** Checklist of freshwater fishes of Iran. FishTaxa, 3(3): 1-95.
- Golzarianpour, K., Abdoli, A., Kiabi, B. and Freyhof, J., 2009.** First record of the miniature loach Turcinoemacheilus kosswigi (Teleostei: Nemacheilidae) in the Karoun drainage, Iran. Zoology of the Middle East, 47:57-62.
- Golzarianpour, K., Abdoli, A., Patimar, R. and Freyhof, J., 2013.** Turcinoemacheilus hafezi, a new loach from the Zagros Mountains, Iran (Teleostei: Nemacheilidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters, 24(1): 41-48.
- Hashemzadeh Segherloo, I., Bernatchez, L., Golzarianpour, K., Abdoli, A., Primmer, C. R. and Bakhtiary, M., 2012.** Genetic differentiation between two sympatric morphs of the blind Iran cave barb *Iranocypris typhlops*. Journal of Fish Biology, 81:1747-53.
- Hall, T., 1999.** BioEdit software, version 5.0.9. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Hebert, P. N. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. and Hallwaches, W., 2004.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 101:14812-14817.
- Karakousis, Y., Triandafyllidis, C. and Economidis, P. S., 1991.** Morphological variability among seven Greek populations of brown trout (*Salmo trutta*). Journal of Fish Biology, 38(6):807-817.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. and Tamura, K. 2008.** MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics, 9(4):299-306.
- Miyazaki, J. I., Nakao, K., Mihara, M., Sakai, T., Gunji, Y., Tojo, K., Muraoka K. and Hosoya, K., 2007.** Incongruence between mtDNA phylogeny and morphological and ecological characters in loaches of the genus *Leufa* (Balitoridae, Cypriniformes). Zoological Science, 24:666-675.

**Nicieza, A. G., 1995.** Morphological variation between geographically disjunct populations of Atlantic salmon: the effects of ontogeny and habitat shift. *Functional Ecology*, 9 448-456.

**Nikmehr, N., Eagderi, S., Poorbagher., H. and Farahmand., H., 2016.** The complete description of the skeletal structure of Hafez loach, *Turcinoemacheilus hafezi* (Cypriniformes, Nemacheilidae). *International Journal Aquatic Biology*, 4(2):117-124.

**Nylander, J., 2015.** MrModeltest v2. 3 software. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Sweden. Available from: <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2>.

**Sayyadzadeh, G., Esmaeili, H. R. and Eagderi, S., 2019.** Taxonomic status of the loaches *Paracobitis vignai* and *P. rhadinaea* (Teleostei: Nemacheilidae) in Iran. *Zoology in the Middle East*, 65(3):221-229.

**Rambaut, A., 2015.** FigTree version 1.4.0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

**Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P., Ayres, L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, A. and Huelsenbeck, P., 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3):539-42.

**Tang, Q., Liu, H., Mayden, R. and Xiong, B., 2006.** Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39:347-357.

**Stamatakis, A., 2014.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9):1312-3.

**Swain, D. P. and Foote, C. J., 1999.** Stocks and chameleons: The use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research*, 43:113-128.

**Ward, D., Zemplak, S., Innes, H., Last, R. and Hebert, D., 2005.** DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences*, 360(1462):1847-57.